

非小细胞肺癌和EGFR





肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,已成为我国城市人口恶性肿瘤死亡原因的第1位。

非小细胞肺癌是起源于支气管黏膜、支气管腺体和肺泡上皮的一类肺恶性肿瘤,显微镜下特点是核异形、细胞较大、胞浆丰富。

根据组织病理学分类可分为腺癌、鳞状细胞癌、腺鳞癌、大细胞癌及肉瘤样癌等亚型。

在我国,非小细胞肺癌为最常见的肿瘤。

据2013年肺癌相关的调查报告,肺癌新发病及死亡数量为恶性肿瘤首位,其中,非小细胞肺癌约占所有肺癌的85%,男性发病率与死亡率均高于女性非小细胞型肺癌包括鳞状细胞癌(鳞癌)、腺癌、大细胞癌,与小细胞癌相比其癌细胞生长分裂较慢,扩散转移相对较晚。非小细胞肺癌约占所有肺癌的80%,约75%的患者发现时已处于中晚期,5年生存率很低。

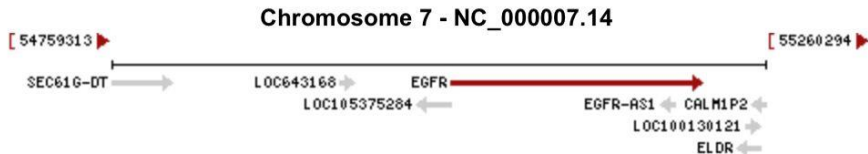


Location: 7p11.2

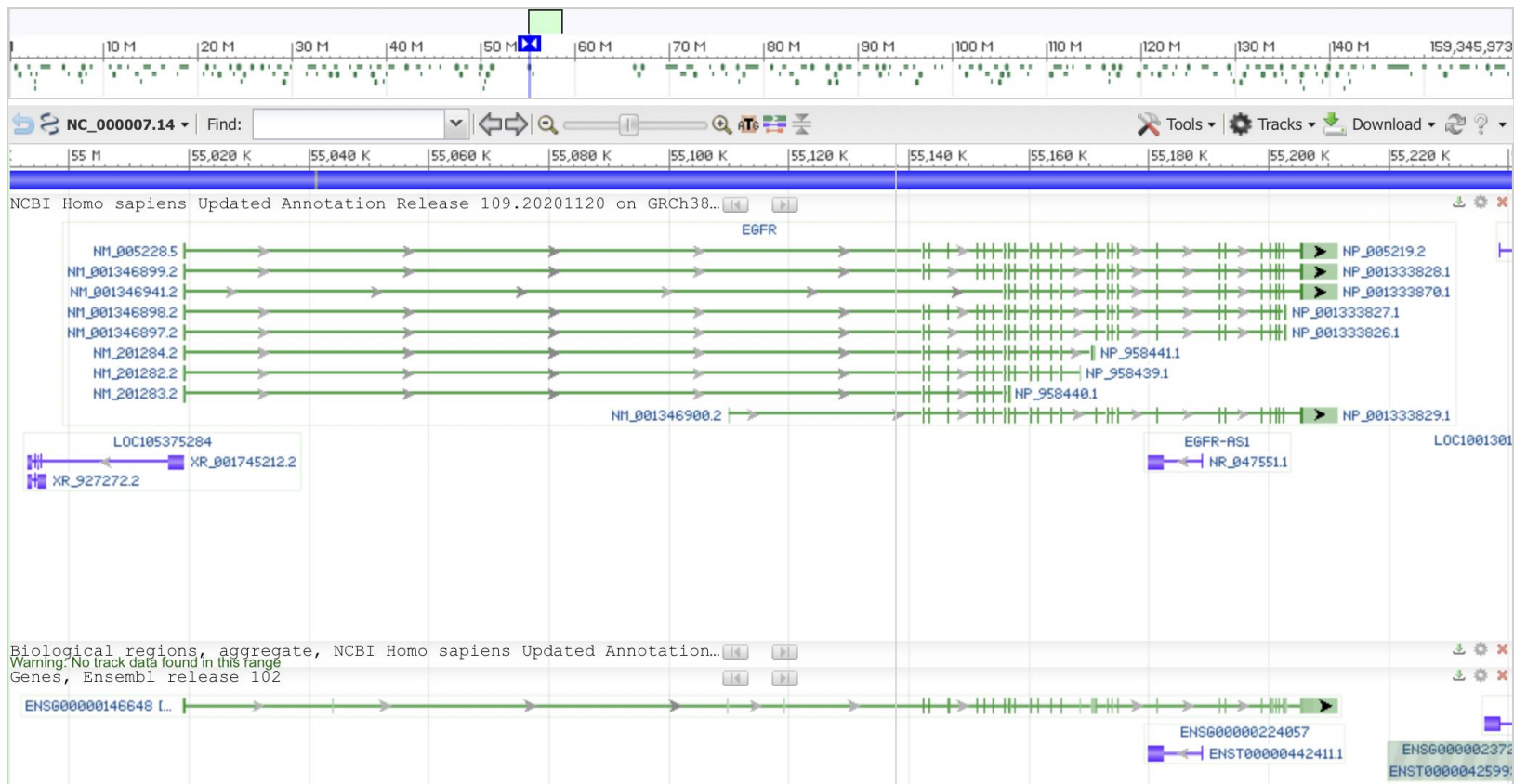
See EGFR in [Genome Data Viewer](#)

Exon count: 31

Annotation release	Status	Assembly	Chr	Location
109.20201120	current	GRCh38.p13 (GCF_000001405.39)	7	NC_000007.14 (55019017..55211628)
105	previous assembly	GRCh37.p13 (GCF_000001405.25)	7	NC_000007.13 (55086678..55279262)



EGFR基因位于人类第七号常染色体短臂上（7P11.2），由31个外显子组成，其编码的 EGFR 是一种将胞外信号传递至胞内的、并具有酪氨酸激酶活性重要途径的跨膜糖蛋白；调控着肿瘤组织细胞的增殖、分化、血管生成及凋亡抑制等机制，从而与恶性肿瘤的生长、侵袭，以及转移等有着密切联系。





Assembly

AGACGTCCGGGCAGCCCCGGCGCAGCGCGGCCGAGCAGCCTCCGCCCCCGCACGGTGTGAGCGCCC
 ACGCGGCCGAGGGCGGCCGGAGTCCCGAGCTAGCCCCGGCGGCCGCCGCCAGACCGGACGACAGGCC
 ACCTCGTCCGGCGTCCGCCGAGTCCCCGCCTCGCCGCAACGCCACAACCACCGCGCACGGCCCCCTGAC
 TCCGTCCAGTATTGATCGGGAGAGCCGGAGCGAGCTCTCCGGGAGCAGCGATGCGACCCCTCCGGGACGG
 CCGGGGCAGCGCTCTGGCGCTGCTGGCTGCGCTCTGCCCGCGAGTCCGGGCTCTGGAGAAAAGAAAGG
 TAAGGGCGTGTCTCGCCGGTCCCGCGCCGCCCCGGATCGCGCCCGGACCCCGCAGCCCGCCAACCG
 CGCACCGGCGCACC GGCTCGCGCCCGCGCCCGCCCGTCTTTCTGTTTCTTGAGATCAGCTGCGC
 CGCCGACCGGGACCGCGGGAGAACGGGACGTTTTCTTCCGGCCGGGAGAGTCTGGGGCGGGCGGAGG
 AGGAGACGCGTGGGACACCGGGCTGCAGGCCAGGCGGGGAACGGCCGCCGGGACCTCCGGCGCCCCGAAC
 CGTCCCAAACCTTTCTCCCTCACTTTCCCGCCAGCTGCGCAGGATGGCGCTCAGTGGGCGAAAGCCGG
 GTGCTGGTGGGCGCCTTGGGCGCAGACCCCGGCCGCTCGCCTGCGCCCGTGTCTTCCAGGGCGCGACGGG
 TCCTGGCGCGCACCCGAGGGGCGGGCGCTGCCACCCCGCGAGACTGCACTGTTTAGGGAAGCTGAGGAA
 GGAACCCAAAAATACAGCCTCCCTCGGACCCCGGGGACAGGCGGCTTTCTGAGAGGACCTCCCGCCT
 CCGCCTCCGCGCAGGTCTCAAACGAAGCCGGCGCCCGCAGCCTGGCCCCGGCCCTCTCAGGTCCC
 CGCGATCCTCGTTCCCAAGTGTGGAGTGCAGCCTCGACCTGGGAGCTGGGAGAACTCGTCTACCACCAC
 CTGCGGCTCCCGGGAGGGGTGGTGTGCGGCGGTTAGTTTTCTGTTGGCAAAGGCAAGTGGGGTCC
 GACCCGCCCTTGGGCGCAGACCCCGGCCGCTCGCCTGCGCCGGTGCGCCCTCGTCTGGCCTATCCAAGA
 GTGCCCCCACCTCCCGGGGACCCAGCTCCCTCCTGGGCGCCCGCGCCGAAAGCCCAAGGCTCTCCTT
 GATGGCCGCTCGCGGAGACGTCCGGGTCTGCTCCACCTGCAGCCCTTCGGTGCGCCTGGGCTTCGCGG
 TGGAGCGGACGCGGCTGTCCGGCCACTGCAGGGGGGATCGCGGGACTCTTGAGCGGAAGCCCGGAAG
 CAGAGCTCATCTGGCCAACACCATGGTGTTCAAAATGGGGCTCACAGCAAACCTCTCCTCAAAACCCG

GAGACTTCTTTCTTGGATGTCTCTTTTTGCTGTTTGAAGAATTTGAGCCAACCAAATATTAACCTGT
 CTTACCGGATTGCTGTCCCTGGTTCAAGTGTGCCAAGT
 GTGCAGACAGAACATGAGCGAGTCTGGCTTCGTGACTACCGACCATAAACCCACTTGACAGGGGAAACAT
 GCCTTGGAAAGTTTTAATTGCACAATTC AACCTT GAGCTGCGCGGTTTCAAAGAGCCAGGCCCGTACTTG
 CTGTTGATGTCATTGGCTTGGGGAGTTGGGGTTTGGTGCCAGCGCGGTCTGTTGGGGAGGGGCAAGGCA
 TAGAACAGTGGTCCAGACCTTGTGTCACATTGGAATTACCTGGGATTA AAAAAAAAAAAAAATCAAACA
 AAAACAGTGTCTGGCTCCCGCCCCAGACATTTCTGATTTAATTGGCATGGGGCAAGACCTGGACTTGGG
 ATTTTTTTAATGCTCTTCATGTGATCTGTTGGGCGAGCCAGATTTGGGGATCACTAGACGGAAGAAGGAT
 TGTTAAAGTCTCCGGAGATGTTACTTGCCAATGCTAAGAGCTCTTTGAGGACATCTGGAATTTGTTACAAT
 ATTGCCAAATATAGGAAAGAGGGAAAAGGTAGAGTGTGATTC AATAAAGGATTCCGCTTTTTCATTG
 AAGGAACTGGTGGAAAGGTTTCTTCTGCTGAGCCTGCAGGCCCGTCTGCTGCTGGGGTGCCCGG
 AGACGCGGGCCTGCTCCGGAGACTGCTGACTGCCGGTCTGTTAGT CAGGTGT CAGCCCTGTCTCTGCCG
 AAGAGACTTCTCTTTATTTTAAATTAACCCCTCAGAGCACCACCAAGCATCACTTTTCTCCCTCCAT
 TGGTGTTCATTCTTTGATGTTACTTGTGTAACACCACTATTAGTAGTTGGAGATTTGTTCTGAGAA
 AAATAAAATACCACTTAATTTGCTGTTTGTCCCGACTTACTCAAAAAGAAATGCTCCTGAAGCAAG
 AGAGAGAGTAGGAGAACAGACGCTATTCATTACAGTAACATAAAAGACTGGATTTTCAGGGGCAAATTA
 TAAATAGGAGATGAGCTCTTTTAAAGAAATTTGTTAAGGCCTGTGTCTATCAAATTCAGTGGATTT
 TATTC AAGATGCATTTGTTTAGTGGGAGTTTGTGTTGGTCTGGGACATGCTA ACTTCTAGACTTGCTG
 CTCTTAGAGGTAATGACTGCCAGACACATTTATGAGTCTAATCCCACATTAAGCATAAGAGGTGCA
 CACTCTCCTATGGGGGAAACTGAGGTACGAAGAAGCTAAAGTACTTTCCACAGCTGGTGGGAGGCA
 GACGGGAAATTCACACCAGGGGCTTCCAACCTCAGATCCCTCTCTCAACTTCCAACCTCACTGCCTTGT
 CCGAGTTCTGGTTTCAGGAGATCAAATCAGGTGTGTGCAAATGTCTAATGT CAGAGCTGGCAAGGGGAA
 AGGGCCAGGGAGCCGGCTCATGACGATGAGCCTGTCTGAAGCTTCAACGCGGGCTGTCCGGCAGTCTGC
 ATCCTGCCGAGTCTCAGCCCTCTGTTGGTCACTTCCATAGAGGCAGCTTAGTCTCAGTTCAGT
 AGCATGGAGTGGAGACTGTTGAGGGGTGCTGAGCAAAGCCCTTACAGGATGAAGGTGCTCTCC
 ...



```

##Genome-Annotation-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
 source              1..192612
                    /organism="Homo sapiens"
                    /mol_type="genomic DNA"
                    /db_xref="taxon:9606"
                    /chromosome="7"
 gene                complement(<1..192)
                    /gene="LOC105375284"
                    /note="Derived by automated computational analysis using
                    gene prediction method: Gnomon."
                    /db_xref="GeneID:105375284"
 mRNA                /db_xref="MIM:131550"
                    join(1..349,123270..123421,124289..124472,127590..127724,
                    132278..132346,133530..133648,134995..135136,
                    136814..136930,137517..137643,137743..137816,
                    138647..138737,141123..141322,142483..142615,
                    144717..144807,146264..146421,152159..152197,
                    153967..154108,154905..155027,155706..155804,
                    162277..162462,172703..172858,173750..173825,
                    179701..179847,181300..181397,182172..182339,
                    182719..182766,183501..183609,186240..192612)
                    /gene="EGFR"
                    /gene_synonym="ERBB; ERBB1; HER1; mENA; NISBD2; PIG61"

```



突变类型:

EGFR基因外显子19突变为最常见的突变类型之一，主要发生在密码子第746~750位的碱基缺失，而导致由它们所编码的蛋白丢失。

①E746- A750 (1) 为外显子 19 的最常见突变类型，共检测出4 例，主要由碱基序列c. 2234至2249共16个碱基缺失，从而导致由密码子第746~750位所编码EGFR蛋白所需的氨基酸（ELREA）丢失。

②E746- A750 (2) 所缺失的15个碱基主要发生在碱基序列c. 2235至 c. 2249，但由密码子编码的氨基酸丢失与类型1相同。

③E746-A750 (3) 所缺失的15个碱基较类型3后移一位，但由此碱基丢失引起的氨基酸丢失与类型1相同。

④E746-A751所缺失16个碱基发生在碱基序列c. 2236至c. 2251，相应的密码子第746 ~751位所编码的氨基酸（EL-REAT）丢失。

⑤L747-P753insS所缺失的18个碱基序列发生在碱基序列c. 2240至c. 2257，从而导致密码子第747 ~753位所编码的氨基酸（LREATSP）丢失，同时由密码子753所编码的脯氨酸（Pro）由新引入的丝氨酸（Ser）所替代。



⑥E746-A750insP所缺失9个碱基发生在碱基序列c. 2236到c. 2244，从而导致由它们所编码的氨基酸（ELR）丢失。同时，碱基序列c. 2248G突变成C，密码子GCA被CCA取代，相应编码的丙氨酸（Ala）错义为脯氨酸（Pro）。

表2 EGFR 外显子 19 基因突变的类型

突变类型	碱基序列 (2416 ~ 2448)	氨基酸序列 (744 ~ 754)
野生型	ATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAA	IKELREATSPK
del E746-A750(1)	ATCAA-----AACATCTCCGAAA	IK-----TSPK
del E746-A750(2)	ATCAAG-----ACATCTCCGAAA	IK-----TSPK
del L747-E749insP	ATCAAGGAA.....CCAACATCTCCGAAA	IKE----PTSPK
del L747-A750insP	ATCAAGGAA-----CCATCTCCGAAA	IKE-----PSPK
del L747-S752	ATCAAGGAA-----CCGAAA	IKE-----PK
del L747-S752ins V	ATCAAGG--TT-----CCGAAA	IKV-----PK
del L747-P753ins S	ATCAAGGAAT-----CGAAA	IKE-----SK

注：核苷酸及氨基酸序列参照 Genbank X00588



EGFR基因外显子20突变，即S768I是由碱基序列 c. 2303G突变为T，第768位密码子AGC转变成ATC，由它所编码的丝氨酸（Ser）被异亮氨酸（Ile）替代。

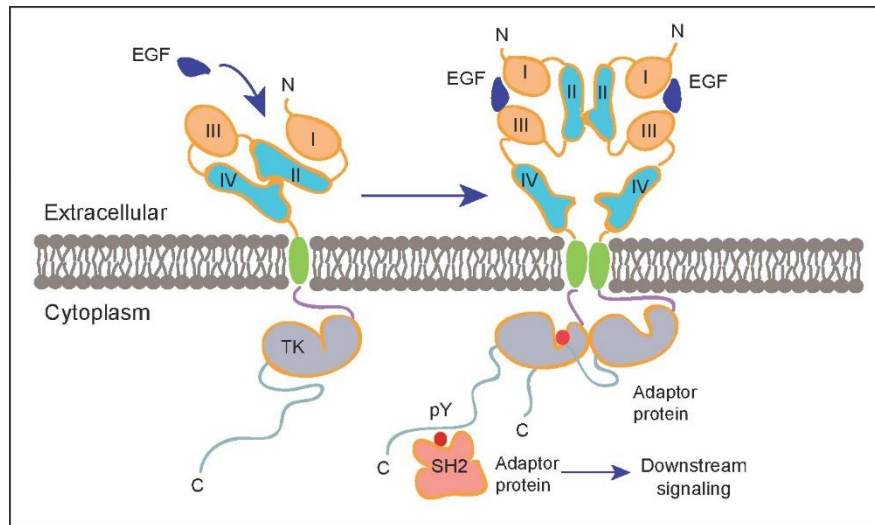
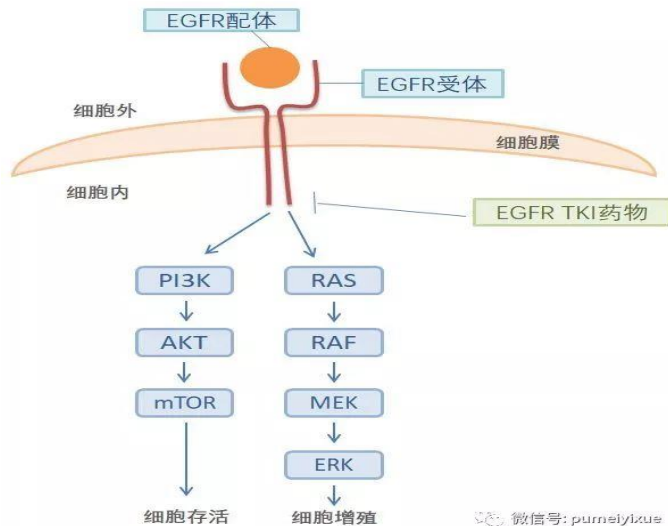
EGFR基因外显子21突变是EGFR基因突变的主要类型之一，均由碱基点错义突变引起，共检测出3种突变类型

- a. L858R突变占绝大部分，共检测出5例。突变发生在碱基序列c. 2573T错义成G，而第858位的密码子CTG转变成CGG，所编码的亮氨酸（Leu）被精氨酸（Arg）替代。
- b. P848L突变发生在碱基序列c. 2543C错义为T，相应的第848位密码子CCG变为CTG，而由密码子所编码的脯氨酸（Pro）替代成亮氨酸（Leu）。
- c. L861Q突变是发生在碱基序列c. 2582T错义为A，以致第861位密码子由CTG转变为CAG，相应编码的亮氨酸（Leu）被谷氨酰胺（Gln）所替代。



EGFR基因负责编码并制造一种称为表皮生长因子受体的受体蛋白。

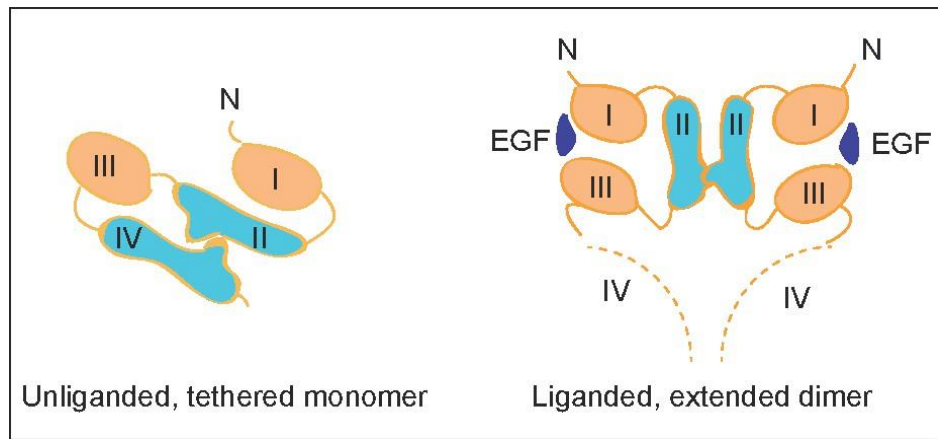
EGFR受体蛋白是一种跨膜蛋白，其分为三部分：蛋白的一端位于细胞外，一部分位于细胞膜，另一端则位于细胞内。其结构由三部分组成：细胞外配体结合域、跨膜区、细胞内酪氨酸激酶域。这允许EGFR受体与细胞外的其他蛋白（称为配体）结合，帮助细胞接收信号并对其环境作出反应。而受体与配体的结合如同钥匙与锁，也因此它们都有特定的结合“伙伴”。当EGFR与配体结合时，它会附着于另一个位于附近的EGFR受体并形成复合物（二聚体），从而进入激活状态，并激活细胞内的信号传导途径。



EGFR激酶受体的激活模型



当与其配体结合后，EGFR可在细胞表面形成同源或异源二聚体引起细胞内酪氨酸激酶域活化，随后参与信号通路的细胞内蛋白发生自磷酸化而激活，从而调节基因转录。激活的EGFR可刺激肿瘤的生长与进展，包括促进增殖、血管生成、浸润、转移和抑制凋亡。



EGFR受体胞外域在配体诱导下的构象变化



EGFR 作为表皮生长因子家族中的一员，能够激活许多经典的信号转导通路，其中重要的一条就是 PI3K/Akt/mTOR 通路。

PI3K是一种可催化磷脂酰肌醇D3位磷酸化的脂类激酶，可以通过与具有磷酸化酪氨酸残基的生长因子受体(如表皮生长因子受体、c-Met等)或连接蛋白相互作用，导致二聚体构象的转变而导致PI3K的活化，活化后的PI3K将导致PIP2转化为PIP3PIP3作为第二信使会进而激活各类下游蛋白[第一条第二款)而阿科特即是PI3K下游的关键蛋白之一.阿科特家族的成员有三个，即Akt1、Akt2和AKT3它们在结构和功能方面很相似，均参与了下游底物的活化，活化后的阿科特则通过磷酸化作用激活MTOR等下游靶蛋白，从而促进细胞的增殖、分化及迁移等。

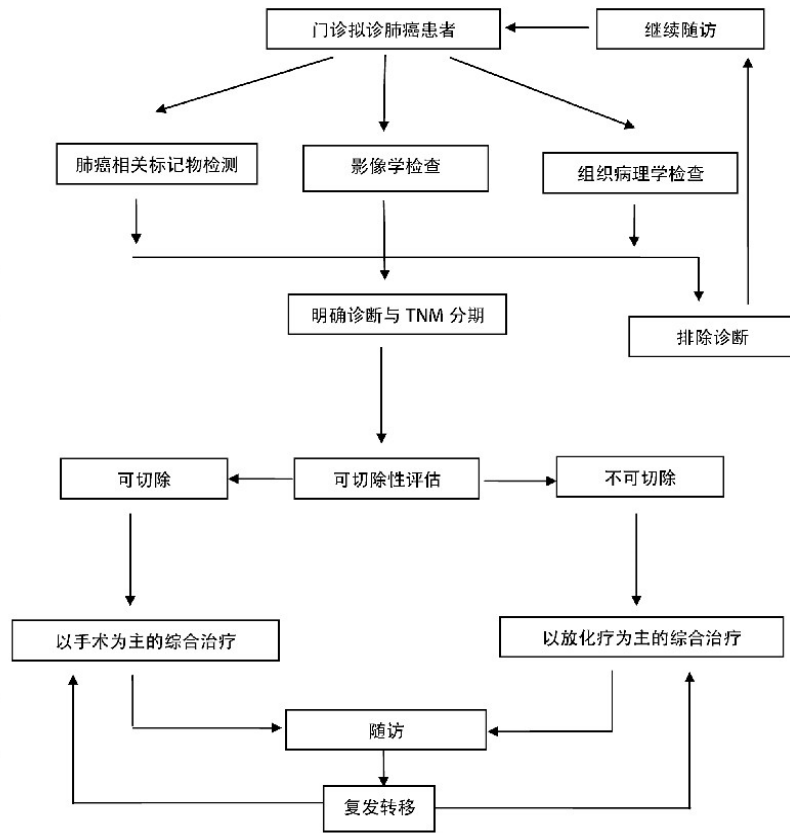


预防

一级预防：戒烟、保护环境、避免致癌物暴露，良好的生物-心理-社会医学模式。

二级预防：对高危人群进行定期筛查。

三级预防：有效的综合治疗；促进恢复，减少复发和并发症，防止残疾和肿瘤转移；减轻疼痛，缓解症状，并提供社会、心理和精神上的支持。





非小细胞肺癌诊断

(一) 高危因素

吸烟史
职业暴露史（石棉）

(二) 临床表现

1. 早期可无明显症状
2. 随病情发展 刺激性干咳、痰中带血或血痰、胸痛、发热、气促
3. 当肺癌侵及周围组织或转移
 肿瘤侵犯喉返神经出现声音嘶哑
 肿瘤侵犯胸膜引起胸膜腔积液，往往为血性；大量积液可以引起气促
 肿瘤侵犯胸膜及胸壁，可以引起持续剧烈的胸痛

(三) 体格检查

(四) 影像检查

胸部X线检查：胸片是早期发现肺癌的一个重要手段，也是术后随访的方法之一
胸部CT检查：胸部CT可以进一步验证病变所在的部位和累及范围，也可大致区分其良、恶性，是目前诊断肺癌的重要手段

(五) 内窥镜检查

(六) 其它检查技术

痰细胞学检查：痰细胞学检查是目前诊断肺癌简单方便的无创伤性诊断方法之一

(七) 血液免疫生化检查

血液生化检查和血液标记物检查并无明显特异性

(八) 组织学诊断

组织病理学诊断是肺癌确诊和治疗的依据



基因突变检测：（以EGFR基因为例，根据EGFR突变状况制定相应的治疗策略）

表3 EGFR 基因突变与患者年龄、性别及组织类型的关系

分析指标	检测例数	基因突变例数			突变发生率 (%)
		外显子 19	外显子 20	外显子 21	
年龄(岁)					
<60	81	15	0	10	30.9
≥ 60	95	22	2	8	33.7
性别					
男	130	25	2	8	26.9
女	46	12	0	10	47.8*
组织类型					
腺癌	67	17	1	12	44.8#
鳞癌	64	12	0	1	20.3
腺鳞癌	30	4	1	5	33.3#
其他	15	4	0	0	26.7
合计	176	37	2	18	32.4

* 女性与男性比较, $P < 0.05$; # 腺癌及腺鳞癌与鳞癌比较, $P < 0.05$

由于文献表明, EGFR基因外显子19的突变发生率较高, 因此可使用PCR技术检测EGFR基因外显子19的突变来进行诊断。



基因突变检测：（以EGFR基因为例）

流程：

1. 标本采集和DNA提取：

1. 肿瘤组织在手术切除后快速冻存于液氮中, 然后在 -80°C 深低温冰箱保存, 同时采集正常肺组织 (与病灶距离5cm以上) 作为对照。

2. 组织样本 (50 mg) 中的DNA提取按照DNAezsol基因组DNA抽提试剂盒 (上海申能博采公司) 说明书操作。经Eppendorf 核酸蛋白测定仪测定DNA纯度及含量, 要求 $4280/4260 > 1.80$, 调整DNA浓度至 $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。

2. PCR扩增和基因测序

① 95°C 5min变性

② 95°C 30s, 57°C 30s, 72°C 45s, 40个循环

③ 72°C 延伸7 min

④扩增产物经1.6%琼脂糖凝胶电泳10 V 30 min后, EB染色摄片

⑤将阳性扩增条带的样本经柱层析分离纯化后, 采用双脱氧链终止法 (Sanger法) 在ABI 3700型DNA序列分析仪上进行基因测序。测序引物采用各外显子的上游引物。



基因突变检测：（以EGFR基因为例）

PCR（用ABI Prism Primer Express软件设计）：

扩增位置：EGFR外显子19

引物：上游——AAC GTC TTC CTT CTC TCT CTG TCA

下游——CCA CAC AGC AAA GCA GAA ACT

退火温度：57° C

产物长度：150bp

反应液：

DNA 4 μ g (100ng)

10 x 缓冲液5 μ g

2.5mmol/L dNTP 5 μ L

上游及下游引物 (20mmol/L) 各1 μ g

Pfu酶 (2.5U/ μ L) 1 μ L(DEPC-H₂O补充至50 μ L)

表1 EGFR 外显子 19 ~ 21 特异性引物序列

外显子	引物	序列(5'-3')	退火温度(°C)	G/C 百分比	产物(bp)
19	上游	AAC GTC TTC CTT CTC TCT CTG TCA	57	52.4	150
	下游	CCA CAC AGC AAA GCA GAA ACT	57	47.6	

为了验证引物的有效性，需要再次打开NCBI，blast设计好的引物的特异性。



Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) ⓘ

```
AAC GTC TTC CTT CTC TCT CTG TCA
CCA CAC AGC AAA GCA GAA ACT
```

Clear

Query subrange ⓘ

From To

**New columns added to the
Description Table**

Click 'Select Columns' or 'Manage Columns'.



Or, upload file

 未选择任何文件 ⓘ

Job Title

 Enter a descriptive title for your BLAST search ⓘ

 Align two or more sequences ⓘ

Choose Search Set

Database

 Standard databases (nr etc.):
 rRNA/ITS databases
 Genomic + transcript databases
 Betacoronavirus

 Human genomic plus transcript (Human G+T) (160592 sequences) ⓘ

Exclude

Optional

 Models (XM/XP)
 Uncultured/environmental sample sequences

Limit to

Optional

 Sequences from type material

Entrez Query

Optional

 Enter an Entrez query to limit search ⓘ

[YouTube](#) [Create custom database](#)

Program Selection

Optimize for

 Highly similar sequences (megablast)
 More dissimilar sequences (discontiguous megablast)
 Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm ⓘ



BLAST® » blastn suite » results for RID-0DFVUGPH01R

[Home](#) [Recent Results](#) [Saved Strategies](#) [Help](#)
[Edit Search](#)[Save Search](#)[Search Summary](#)
[How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)
Job Title**Nucleotide Sequence**

RID

[0DFVUGPH01R](#) *Search expires on 01-20 18:16 pm*[Download All](#)**Program**BLASTN [Citation](#)**Database**Human G+T (2 databases) [See details](#)**Query ID**

lcl|Query_64291

Description

None

Molecule type

dna

 length
Filter Results
Organism *only top 20 will appear* exclude

 [Add organism](#)
Percent Identity
 to
E value
 to
Query Coverage
 to
[Filter](#)[Reset](#)
[Feedback](#)



Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▾ New Select columns ▾ Show 100 ▾

select all 0 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results New MSA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Genomic sequences <input type="checkbox"/>									
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 7, GRCh38.p12 Primary Assembly	Homo sapiens	44.6	44.6	53%	0.002	100.00%	159345973	NC_000007.14

Feedback



□ [Download](#) □ [GenBank](#) [Graphics](#)

Homo sapiens chromosome 7, GRCh38.p12 Primary Assembly

Sequence ID: [NC_000007.14](#) Length: 159345973 Number of Matches: 1

Range 1: 55174695 to 55174718 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
44.6 bits(48)	0.002	24/24(100%)	0/24(0%)	Plus/Plus

Features: [epidermal growth factor receptor isoform i precursor](#)
[epidermal growth factor receptor isoform f precursor](#)

```

Query 1      AACGTCTTCCTTCTCTCTGTCA 24
             |||
Sbjct 55174695 AACGTCTTCCTTCTCTCTGTCA 55174718
  
```

可见，引物有效



基因突变检测：（以EGFR基因为例）

结果：

据文献实验，外显子19突变主要是第746 — 753位密码子的碱基缺失，共有7种突变类型。

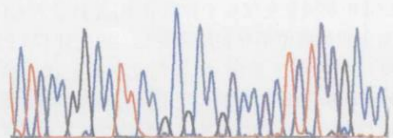
野生型-正常基因

表2 EGFR 外显子 19 基因突变的类型

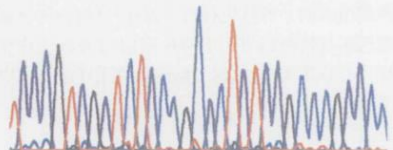
突变类型	碱基序列 (2416 ~ 2448)	氨基酸序列 (744 ~ 754)
野生型	ATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAA	IKELREATSPK
del E746-A750(1)	ATCAA-----AACATCTCCGAAA	IK-----TSPK
del E746-A750(2)	ATCAAG-----ACATCTCCGAAA	IK-----TSPK
del L747-E749insP	ATCAAGGAA-----CCAACATCTCCGAAA	IKE----PTSPK
del L747-A750insP	ATCAAGGAA-----CCATCTCCGAAA	IKE-----PSPK
del L747-S752	ATCAAGGAA-----CCGAAA	IKE-----PK
del L747-S752ins V	ATCAAGG--TT-----CCGAAA	IKV-----PK
del L747-P753ins S	ATCAAGGAAT-----CGAAA	IKE-----SK

注：核苷酸及氨基酸序列参照 Genbank X00588

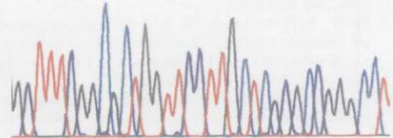
野生型 (正向)
'ATCAAGGAATTAAAGAGAAGCAACATCTCCGAAA'



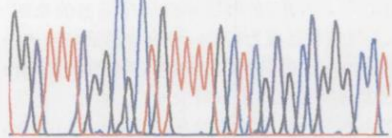
E746-A750 (2) (正向)
TCCCGTCGCATCAAGACATCTCCGAAAGCCAA



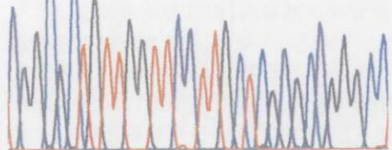
del L747-A750ins P(反向)
GCTTTCGGAGATGGTTCCTTGATAGCGACGGGAAT



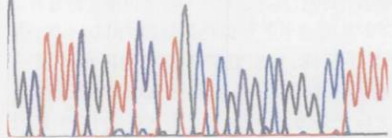
del E746-A750(1) (反向)
GGCTTTCGGAGATGTTTGGATAGCGACGGGAAT



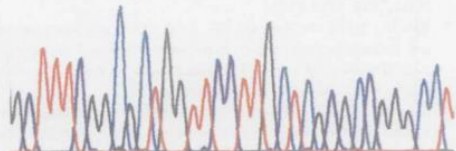
del L747-E749ins P(反向)
CGGAGATGTTGGTTCCTTGATAGCGACGGGAAT



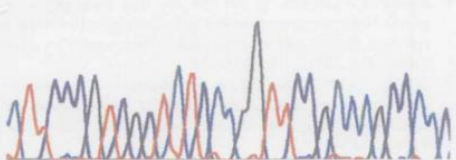
del L747-S752(反向)
GGCTTTCGGTTCCTTGATAGCGACGGGAATTTT



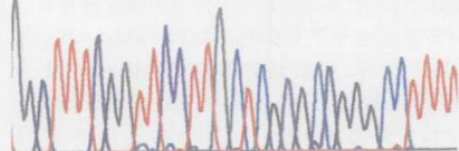
del L747-A750ins P(反向)
GCTTTCGGAGATGGTTCCTTGATAGCGACGGGAAT



del L747-S752ins V(正向)
ATTCCCGTCGCATCAAGGTTCCGAAAGCCAAAC



del L747-S752(反向)
GGCTTTCGGTTCCTTGATAGCGACGGGAATTTT



del L747-L753ins S(正向)
ATTCCCGTCGCATCAAGGAATCGAAAGCCAACA

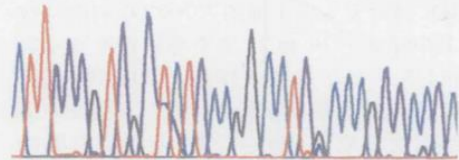


图1 EGFR 基因外显子 19 的序列分析结果

7 靶向药的基因检测（组织标本和血液标本）

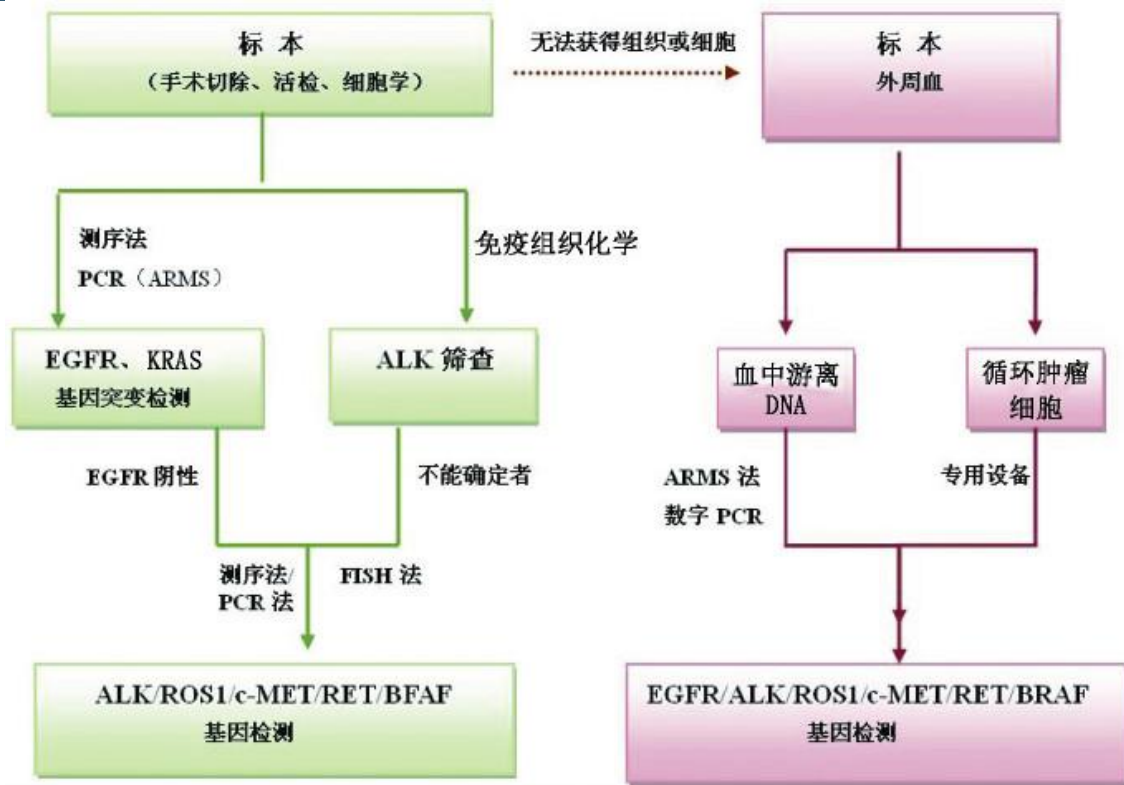


图1 非小细胞肺癌患者常见靶向治疗相关基因检测流程

7 靶向药的基因检测（组织标本和血液标本）



特异性分子治疗NSCLC靶向药物的应用越来越广泛，常见的有单克隆抗体与小分子酪氨酸激酶抑制剂（TKI）等靶向药物。

①单克隆抗体主要是作用于胞外区，可对配体与EGFR的结合产生竞争性的抑制，使受体失去活性，或者是加快受体降解，从而停止致癌信号的传递，从而对患者的疾病起到治疗效果，这类药物的典型代表就是西妥昔单抗。

②EGFR-TKI进入细胞内，并直接作用于EGFR的胞内区，从而干扰三磷酸腺苷（ATP）的结合，抑制酪氨酸激酶磷酸化，从而产生治疗作用，这类药物的典型代表有厄洛替尼、吉非替尼。



③有研究指出，EGFR - 激酶域突变可导致17外显子的核苷酸2482到2496位或者是2481到2495位缺失，与特异性EGFR-TKI的反应有关系，靶向药物吉非替尼和厄洛替尼有明显疗效。

④而在NSCLC患者中一个异常的EGFR无义突变，临床上反映联合化疗药物厄洛替尼的敏感性低。

小结：NSCLC患者当中的EGFR基因突变可以作为疾病治疗的一个敏感性预测因子，可以将EGFR突变检测结果作为参考依据，来对患者的临床用药及个体化治疗起到指导作用。



当前，包括小分子酪氨酸激酶抑制剂（TKIs）和靶向EGFR的单克隆抗体都集中于抑制EGFR激酶活性或诱导抗体和补体介导的细胞毒性作用。其中靶向EGFR的单克隆抗体主要用于治疗晚期结直肠癌和头颈部肿瘤，但其临床治疗效果不佳，因此不适用于治疗NSCLC。

迄今为止已经开发了三代EGFR 酪氨酸激酶抑制剂（TKIs）可逆地（第一代）或不可逆地（第二代和第三代）抑制EGFR酪氨酸激酶活性，并已广泛用于NSCLC治疗。



- 吉非替尼和厄洛替尼是针对野生型EGFR设计的第一代EGFR TKIs，但对活性EGFR突变显示出强大的选择性抑制作用。
- 二代EGFR TKIs（如阿法替尼、达可替尼）被设计用于克服一代EGFR TKIs的获得性T790M耐药性，但由于毒性不可接受失败了。
- 新开发的第三代EGFR TKIs（如奥希替尼和诺司替尼）与EGFR ATP结合位点上的半胱氨酸-797残基不可逆结合，对T790M耐药突变的EGFR形式显示出优先的活性。



促进EGFR降解

大量研究表明，EGFR空间分布和稳定性也是调节肺癌进展的关键决定因素。即使在突变的EGFR驱动的肺腺癌中，EGFR降解失调也进一步加速了肿瘤的发生和发展。表皮生长因子受体的空间失调增加了质膜受体的可用性，并诱导持续的信号输出、EGFR激活时间延长和癌进展。这些发现都强调了促进EGFR降解是靶向EGFR相关癌症的一种替代策略。



大胆猜想：

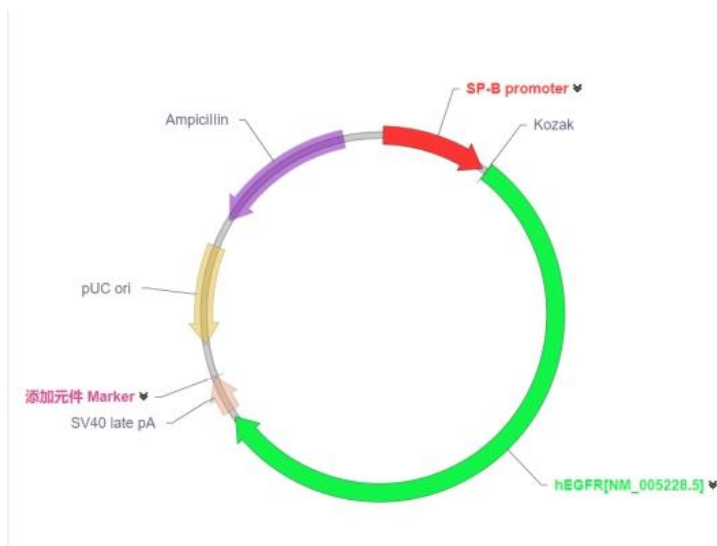
- ① 基因矫正（将缺失的碱基补上）
- ② 基因置换：用正常基因通过重组原位替代致病基因
- ③ 基因添加：额外插入正常基因，在体内表达正常功能的蛋白
- ④ 基因沉默或失活：导入非编码RNA，如microRNA，降解异常mRNA或阻断其复制，阻断致病基因的表达
- ⑤ 自杀基因：导入特殊酶类产生肿瘤细胞毒性代谢物。
- ⑥ 靶向基因敲除技术敲除耐药基因



1. 使用PCR方法获取EGFR基因

2. 构建表达载体

选择载体：哺乳动物基因表达载体（如pVAX1哺乳动物表达载体质粒）使用相应的限制性核酸内切酶，DNA连接酶，将载体DNA和所获取的DNA重组





其中包含的元件及其分析如下：

名称: Kozak

描述: Kozak translation initiation sequence

应用注释: Facilitates translation initiation of ATG start codon downstream of the Kozak sequence.

类型: Miscellaneous

参考文献: Nucleic Acids Res. 9:5233 (1981)

序列 (Length: 6 bp)

1 GCCACC



名称: SV40 late pA

描述: Simian virus 40 late polyadenylation signal

应用注释: Allows transcription termination and polyadenylation of mRNA transcribed by Pol II RNA polymerase.

类型: PolyA_signal

参考文献: Mol. Cell. Biol.9:4248 (1989)

序列 (Length: 222 bp)

```
1 CAGACATGAT AAGATACATT GATGAGTTTG GACAAACCAC AACTAGAATG CAGTGAAAAA AATGCTTTAT TTGTGAAATT TGTGATGCTA TTGCTTTATT
101 TGTAACCATT ATAAGCTGCA ATAAACAAGT TAACAACAAC AATTGCATTC ATTTTATGTT TCAGGTTTCAG GGGGAGGTGT GGGAGGTTTT TTAAAGCAAG
201 TAAAACCTCT ACAAATGTGG TA
```



名称: pUC ori

描述: pUC origin of replication

应用注释: Facilitates plasmid replication in E. coli; regulates high-copy plasmid number (500-700).

类型: Rep_origin

亚型: E. coli replication_origin

参考文献: Mol Microbiol. 6:3385 (1992)

序列 (Length: 589 bp, complement strand on vector)

```
1  TTGAGATCCT TTTTTTCTGC GCGTAATCTG CTGCTTGCAA ACAAAAAAAC CACCGCTACC AGCGGTGGTT TGTTTGCCGG ATCAAGAGCT ACCAACTCTT
101 TTTCCGAAGG TAACTGGCTT CAGCAGAGCG CAGATACCAA AACTGTCTCT TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG GCCACCACTT CAAGAACTCT GTAGCACCGC
201 CTACATACCT CGCTCTGCTA ATCCTGTTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC GATAAGTCGT GTCTTACCGG GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA
301 GGC GCAGCGG TCGGGCTGAA CGGGGGGTTT GTGCACACAG CCCAGCTTGG AGCGAACGAC CTACACCGAA CTGAGATACC TACAGCGTGA GCTATGAGAA
401 AGCGCCACGC TTCCCGAAGA GAGAAAGGCG GACAGGTATC CGGTAAGCGG CAGGGTTCGA ACAGGAGAGC GCACGAGGGA GCTTCCAGGG GGAAACGCCT
501 GGTATCTTTA TAGTCCTGTC GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA TTTTGTGAT GCTCGTCAGG GGGGCGGAGC CTATGGAAA
```



名称: Ampicillin

描述: Ampicillin resistance gene

应用注释: Allows E. coli to be resistant to ampicillin.

选择抗药性: Ampicillin

用法: Positive selection

类型: ORF

亚型: E. coli selection marker

参考文献: Proc Natl Acad Sci U S A. 75: 3737 (1978)

序列 (Length: 861 bp, complement strand on vector)

```

1  ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCTT ATTCCCTTTT TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTTTGCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
101 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT
201 GAGCACTTTT AAAGTTCTGC TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC ACTATTCTCA GAATGACTTG
301 GTTGTAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
401 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTTG CACAACATGG GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT
501 GAATGAAGCC ATACCAAACG ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAC GTTGCGCAAA CTATTAAGTG GCGAACTACT TACTCTAGCT
601 TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG
701 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAAGCCCT CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC
801 TATGGATGAA CGAAATAGAC AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTGGTA A

```



3. 转化

4. 重组体筛选：抗药性筛选，利用ampicillin抗药基因筛选

5. 克隆基因的表达：导入细胞

The image features a central dark blue circle with the Chinese characters '谢谢' (Thank you) in white. The circle is surrounded by a white dashed border. In the top-left and bottom-right corners, there are abstract geometric designs consisting of overlapping triangles and lines in shades of blue, black, and white, creating a sense of depth and movement.

谢谢